

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-155792

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)7月3日

C 12 P 17/08
A 23 L 1/226

G 8931-4B
7823-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全5頁)

⑮ 発明の名称 5-デカノライド及びその製造方法

⑯ 特 願 平2-260333

⑰ 出 願 平2(1990)9月28日

優先権主張 ⑱ 1989年9月28日 ⑲ 欧州特許機構(E P) ⑳ 89202426.6

㉑ 発 明 者 ヴィルヘルムス・タイ オランダ国4761 エムエス ザイベンバーゲン, グロー
オドルス・アントニウ テ・ヴァート 48
ス・マリア・デ・ラー
ト

㉒ 出 願 人 ビーエフベー・(ネー オランダ国アメルスフオルト, ニューフェルハイズベツ
デルランド)・ベシュ グ・ツイト 7
トローテン・フエンノ
ツトシャフト

㉓ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

5-デカノライド及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 天然2-デセン-1,5-オライドのバイオ
触媒還元によって得られる5-デカノライド。

2. 天然2-ドデセン-1,5-オライドのバイ
オ触媒還元によって得られる5-ドデカノライド。

3. 1種類以上の酵母または1種類以上の真菌
を用いた、天然2-デセン-1,5-オライドと天
然2-ドデセン-1,5-オライドとの複二重結合
のバイオ触媒還元を含む5-デカノライド及び5
-ドデカノライドの製造方法。

4. 酵母がサッカロミセスセレビジアである
請求項3記載の方法。

5. 真菌がボリボラス デュラス(CBS 313.36)、
イシュノデルマ ペンゾイニウム(CBS 311.29)、
ビエルカ^ンデラ アグスタ(CBS 595.78)、ボリア
キサクタ(CBS 332.29)またはプロイロタス オス
トリータス(CBS 411.71)である請求項3記載の方

法。

6. 基質を段階的または連続的に加える請求項
3~5のいずれかに記載の方法。

7. バイオ触媒反応を例えばグルコースのよう
な共基質の存在下で実施する請求項3~6のい
ずれかに記載の方法。

8. 共基質を段階的または連続的に加える請求
項3~7のいずれかに記載の方法。

9. バイオ触媒反応を有機溶媒、有機樹脂また
は他の包接試薬の存在下で実施する請求項3~8
のいずれかに記載の方法。

10. 包接試薬がシクロデキストリンである請求
項3~9のいずれかに記載の方法。

11. バイオ触媒反応を固定形で用いる請求項3
~10のいずれかに記載の方法。

12. 請求項1または2に記載の、または請求項
3~11のいずれかに記載の方法によって製造した
5-デカノライド及び/または5-ドデカノライ
ドを含むフレーバー。

13. 請求項12記載のフレーバーを含む消費製品。

3. 発明の詳細な説明

本発明は天然のデルターラクトンとその製造方法に関する。さらに詳しくは、本発明は天然の5-デカノライドと5-ドデカノライド及び天然の出発物質とバイオ触媒 (biocatalyst) とを用いた製造方法に関する。

フレーバー化合物 (flavoring compound) を使用する場合に、フレーバー化合物が「天然」と呼ばれることがしばしば非常に問題である。実際にこのことはフレーバー化合物が植物または動物起源の産物から物理的、酵素的または微生物学的方法によって得られ、石油化学誘導産物を含まないことを意味する。

デルターラクトンは酪農産物中に天然に生成し、酪農フレーバー (dairy flavor) の重要な成分である。しかし、例えばバターのような天然産物から費用のかかる、非経済的な単離による以外の経路によって得られる天然の5-デカノライドまたは5-ドデカノライドは存在しない。天然フレーバー中へのこれらの化学物質 (chemicals) の使用は、

1979-1980)。基材は自然界に存在することは知られていたが、容易に利用できるものはなかった。

本発明は、対応する天然不飽和5-オライドのバイオ触媒還元によって得られる天然5-デカノライドおよび天然5-ドデカノライドに関する。

これらのフレーバー化合物を上記で定義したような天然方法で、経済的に魅力あるように製造する方法は今までに存在しなかったもので、これらのフレーバー化合物は新規な生成物である。不飽和5-オライドの微生物水素化では、出発物質と生成物の両方が微生物にとって非常に有害であるので微生物が経済的に魅力あるために十分な量でこれらの生成物を製造することができないと、当業者は考える。それにも拘らず、これらの生成物を微生物水素化によって製造することが意外にも判明した。さらに詳しくは、マッソイバーク油 (Massoi bark oil) またはその留分の酵母もしくは真菌による微生物水素化によってこれらの5-オライドを製造することが可能である。

文献によれば、パン酵母はC=O又はC=C二

重結合のプロセスとプロセスに用いられる基質とがいわゆる天然状態を有することを必要とする。今までに、天然のデルターラクトンの製造方法は開示されていない。

米国特許第3,076,750号では、酵母による合成5-オキソ酸の還元が述べられている。この方法は高濃度の光学活性デルターラクトンを製造するが、このような化合物は天然と見なされない。

先駆物質として植物油を用いた醗酵プロセスによる天然ガンマラクトンの製造を扱ったかなりの量の文献が存在する (ベルガー等 (1986年)、ゼット・ナツウールホルシュ (Z. Naturforsch) 41C巻、963-970頁; ファーブッド (Farboud) 等 (1983年)、米国特許第40832/01072号; チーサム (Cheetham) 等 (1988年)、ヨーロッパ特許第0,258,993号)。

Cardilloらは、 C_{12} - C_{18} ガンマヒドロキシアルケン脂肪酸の C_6 及び C_{11} デルタラクトンと、 C_6 、 C_{10} および C_{14} ガンマラクトンへの転化について開示する (Cardilloら、1989, J. Org. Chem. 54,

重結合の不整還元をすることができるとされている (Gronatka, 1988, Chm. Osci. 6, 17-20)。パン酵母は最も一般的にはカルボニル化合物を立体選択的に還元して光学的に活性なアルコールにするためのバイオ触媒として使用される。パン酵母の α 、 β -不飽和カルボニル化合物のC=C二重結合の水素添加は、広範囲ではないがよく調べられた還元反応である (Daviesら、"Biotransformations in preparative organic chemistry", Academic Press, 1989, p.127-136)。しかし、 α 、 β -不飽和ラクトン類のバイオ触媒による水素添加は以前には述べられていない。

本発明はまた、例えばサッカロミケス セレヴィジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のような酵母菌株または不完全真菌を用いて、天然2-デセン-1,5-オライドと天然2-ドデセン-1,5-オライドとの環二重結合をバイオ触媒還元を行うことから成る天然5-デカノライドと天然5-ドデカノライドとの製造方法にも関する。

前記に2種類のフレーバー化合物はこの方法に

よって高収率が得られる。上述したように、出発物質と生成物との性質を考慮するとこのことはまったく予想されないことであった。

本発明の方法には、酵母種または真菌種を用いることができる。好ましい種はサッカロミセス セレヴィジアエ、ポリボラス デュラス (*Polyporus durus*)、イシュノデルマ ベンゾイニウム (*Ischnoderma benzoinum*)、ビエルカデラ アグスタ (*Bjerkandera adusta*)、ボリア キサンタ (*Poria Xantha*)およびプロイロタス オストリータス (*Pleurotus ostreatus*)である。

好ましい微生物は、良好な収量を与え、しかも非常に容易に得られることからパン酵母である。

この方法はバイオ触媒反応の通常のやり方で実施される。バイオ触媒すなわち微生物または微生物から得られる酵母を遊離形または固定形のいずれかで用いることが可能である。

バイオ還元(bioreduction)中に用いられる補因子を再生するために、グルコースのような共基質(cosubstrate)が存在することが好ましい。バイ

とを回避するために、細胞懸濁液に基質を段階的にまたは不飽和ラク톤の総濃度が0.2g/lの好ましい濃度を決して超えないことを可能にするような速度で連続的に加えることが好ましい。

さらに、例えばヘアクトンとオクタンのような有機溶媒および例えばアンバーライト(Amberlite) XADのような有機樹脂、及びシクロデキストリンのような他の包接試薬を反応混合物に加えて、抑制を阻止することもできる。

バイオ転化は約100~1000rpmで攪拌されるタンクまたは醗酵器内で実施される。温度は約15~37℃、好ましくは27~35℃にプロセスを通して維持する。

反応が完成(転化率>99%)した後に、ブロス(broth)を伊過し、バイオ触媒を緩衝液で洗浄することができる。伊液と洗浄緩衝液とを回収し、例えばペンタン/ジクロロメタン(2:1)のような有機溶媒で抽出することができる。抽出物を例えば無水Na₂SO₄上で乾燥させ、次に溶媒を蒸発させることによって生成物が得られる。GLCに

バイオ触媒を維持するに、窒素源、ミネラル、ビタミン類及び他の添加物が存在してもよい。好ましい実施態様によると、基質の毒性を回避する及び/またはバイオ触媒を生ずるために、有機溶媒または例えば樹脂や他の包接試薬のような吸着剤が存在することもできる。

ここに開示した酵母と真菌は基質としてマツノイバーク油を用いて、天然5-オライドを製造することができるが、これらの菌株と酵母および真菌の範囲内の他の菌株との使用に決定性はない。

市販のパン酵母または他の菌株をpH約2.5~7.0、好ましくは3.0~6.0の50mMリン酸塩緩衝液中に約10~1500g/l(湿重量)、好ましくは50~250g/lの最終濃度で懸濁させることができる。この方法の好ましい実施態様では、酵素還元のために必要な還元当量の再生のために、バイオ転化緩衝液(bioconversion buffer)に好ましくは糖、さらに好ましくはグルコースである共基質約0.001~25%、好ましくは0.01~2.5%を加える。

反応速度の基質抑制とバイオ触媒への基質毒性

よって抽出物の分析を実施した。バーク油(bark oil)またはプロセス中に加えた純粋な不飽和ラクタンに基づいて収率>90%で、純度>99%の生成物が得られる。

この方法の例を次に記載するが、これらの例は本発明を説明するものであり、限定するものではない。

例 1

サッカロミセス セレヴィジアエをグルコース2.5%と2-デセン-1,5-オライド0.100g/lとの存在下、pH5.0においてインキュベートする。2.5g/l(乾燥重量)のバイオマス(biomass)濃度、30℃および100rpmにおいてバイオ転化を実施する。2時間のインキュベーション後に、5-デカノライドの収率は0.090g/l(90%)である。

例 2

サッカロミセス セレヴィジアエはグルコース2.5% pH 5.5のリン酸塩緩衝液中15.0g/l(乾燥重量)の濃度において、グルコースを15g/l、hr.で連続的に添加しつつ、攪拌醗酵器内でイン

キュベートされる。2-デセン-1,5-オライドを0.100g/ℓ, hr. で段階的に加えながら、バイオ転化プロセスを35℃、500rpmにおいて実施する。16時間のインキュベーション後に、5-デカノライドの収率は1.41g/ℓ (88%)である。

例 3

インキュベーションが2%のシクロデキストリンの存在下で行われ、2-デセン-1,5-オライドが0.2g/ℓ, hr. で添加される以外は例2と同様に実施する。8時間のインキュベーション後に、5-デカノライドの収率は1.25g/ℓ (78%)であった。

例 4

ヘブタン5%をバイオ転化混合物に加え、2-デセン-1,5-オライドの濃度が0.200g/ℓである以外は、例1と同様に実施する。4時間のインキュベーション後に、5-デカノライドの収率は0.088g/ℓ (44%)である。

例 5

ポリボラス デュラス (CBS 313.36) をマ

施する。回収した菌糸を、グルコース2.5%含有のpH 4.0のリン酸塩緩衝液中に100g/ℓ (湿重量)の濃度で再懸濁する。2-デセン-1,5-オライドを2時間の間隔をおいて0.140g/ℓずつ3段階で加えながら、バイオ転化する30℃、100rpmにおいて実施する。6時間のインキュベーション後に、5-デカノライドの収率は0.142g/ℓ (87%)である。

例 7

基質として粗マツソインパーク油を2時間の間隔をおいて0.100g/ℓずつ4回にわけて加える以外は、例6と同様に実施する。8時間後に、5-デカノライドと5-ドデカノライドとの濃度はそれぞれ0.324g/ℓと0.02g/ℓである。飽和5-オライドの収率は95%である。

例 8

バイオマス200g/ℓを用い、2-デセン-1,5-オライドを1時間の間隔をおいて0.100g/ℓずつ4回に分けて加えた以外は、例6と同様に実施した。4時間後に、菌糸体を回収し、洗浄し、前

ルト抽出寒天スラント上に維持し、グルコース3%、アスパラジン0.45%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、 KH_2PO_4 0.15%、チアミン 0.005%、トリグリセリド、好ましくは大豆油またはミグリオール (miglyol) 1%および微量元素 FeCl_3 、 FeSO_4 、 MnSO_4 、 CuCl_2 すべて5mg/ℓならびに CaCl_2 、 ZnCl_2 2mg/ℓを含む栄養培地上で培養する。培地の初期pHは6.0である。培養は培地100mlを含むインキュベーターシェーカー攪拌300mlエーレンマイヤーフラスコ内で200rpm、28℃において実施する。10日間増殖させた後に、細胞を回収する。回収した菌糸体をグルコース2.5%と2-デセン-1,5-オライド 0.140g/ℓとの存在下でpH3.0においてインキュベートする。60g/ℓ (湿重量)のバイオマス濃度、30℃および100rpmにおいてバイオ転化を実施する。6時間のインキュベーション後に、5-デカノライドの収率は0.122g/ℓ (87%)である。

例 6

培養を7日間実施する以外は、例5と同様に実

記と同じ率で2-デセン-1,5-オライドを段階的に3回に分けて加えながら、さらに3時間再びインキュベートした。このプロセスは4時間後と7時間後に、それぞれ5-デカノライド0.222g/ℓと0.578g/ℓを生じた (収率: 5-デカノライド83%)。

例 9

イシユノデルマ ベンゾイニウム (CBS 311.29) を例5と同様に21日間培養する。回収した菌糸をバイオマス濃度20g/ℓ (湿重量)および2-デセン-1,5-オライド 0.100g/ℓの存在下で例5と同様なバイオ還元プロセスに用いる。3時間後に、5-デカノライド 0.021g/ℓが得られる (収率: 5-デカノライド21%)。

例 10

ビエルカンデラ アグスク (CBS 595.78) を例5と同様に30日間培養する。回収した菌糸体を例5と同様なバイオ還元プロセスに、バイオマス濃度20g/ℓ (湿重量)および2-デセン-1,5-オライド 0.100g/ℓの存在下で用いる。


3.75時間後に、5-デカノライド 3.097 g / 2 が得られる (収率: 5-デカノライド 97%)。

例 11

ポリア キサンタ (CBS 332.29) を例 5 と同様に30日間培養する。回収した菌糸を例 5 と同様なバイオ還元プロセスに、バイオマス濃度 20 g / 2 (湿重量) および 2-デセン-1,5-オライド 0.100 g / 2 の存在下で用いる。5時間後に、5-デカノライド 0.015 g / 2 が得られる (収率: 5-デカノライド 15%)。

例 12

プロイロタス オストリータス (CBS 411.71) を例 5 と同様に30日間培養する。回収した菌糸体を例 5 と同様なバイオ還元プロセスに、バイオマス濃度 20 g / 2 (湿重量) および 2-デセン-1,5-オライド 0.100 g / 2 の存在下で用いる。4.75時間後に、5-デカノライド 0.023 g / 2 が得られる (収率: 5-デカノライド 23%)。

代理人 弁理士 湯 浅 器 
(外 4 名)

第 1 頁の続き

⑨Int. Cl. 識別記号 庁内整理番号
 //(C 12 P 17/08
 C 12 R 1:865)
 (C 12 P 17/08
 C 12 R 1:645)

⑩発 明 者 ベーター・ハンス・ヴァン・デア・スキヤフト オランダ国3831 ウエーハー ルースデン, ヴォゲルヴィツケ 18